

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

24. 3. 2004

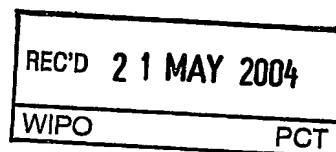
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 3月24日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-080763
[ST. 10/C]: [JP2003-080763]

出 願 人
Applicant(s): 株式会社三菱化学ヤترون
大塚製薬株式会社

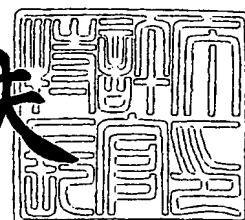


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月2日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 IAT03001P
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明者】

【住所又は居所】 徳島県板野郡北島町高房字東野神本 1 3 - 6

【氏名】 立川 哲也

【発明者】

【住所又は居所】 徳島県板野郡松茂町中喜来字群恵 2 5 2 - 8

【氏名】 赤松 優

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区東神田 1 丁目 1 1 番 4 号 株式会社ヤト
ロン内

【氏名】 澤井 時男

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区東神田 1 丁目 1 1 番 4 号 株式会社ヤト
ロン内

【氏名】 西村 文子

【特許出願人】

【識別番号】 000138277

【氏名又は名称】 株式会社ヤトロン

【特許出願人】

【識別番号】 000206956

【氏名又は名称】 大塚製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100090251

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 憲一

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 017813

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アディポネクチン分析用ラテックス試薬及びアディポネクチン分析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液を含む、アディポネクチン分析用ラテックス試薬。

【請求項 2】 (1) アディポネクチンを含む可能性のある生物学的液体を取得する工程、及び

(2) 前記工程で取得した生物学的液体を、前記工程で取得した状態のままで、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液と接触させ、ラテックス粒子の凝集度合いを光学的に分析する工程を含む、アディポネクチン分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アディポネクチン分析用ラテックス試薬及びアディポネクチン分析方法に関する。なお、本明細書における前記「分析」には、分析対象物質の量を定量的又は半定量的に決定する「測定」と、分析対象物質の存在の有無を判定する「検出」との両方が含まれる。

【0002】

【従来の技術】

アディポネクチンは、1996年に松澤（大阪大学分子制御内科学）等のグループにより、脂肪組織中に特異的に発現する遺伝子 a p M 1 (adipose most abundant gene transcript) の遺伝子産物として新たに同定された 244 個のアミノ酸からなる分泌タンパク質である（非特許文献 1 及び 2）。アディポネクチンは、正常ヒト血中に数 μg ～数十 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と高濃度に存在するが、脂肪細胞特異的分泌タンパク質でありながら、肥満者では有意に血中濃度が低値をとり、冠動脈疾患や 2 型糖尿病、特に大血管症合併例でアディポネクチンの低下を認める。また、アディポネクチンは、インスリン抵抗性及び動脈硬化双方にかかわる分

子と捉えることができる。前記アディポネクチンを迅速且つ正確に測定することは、冠動脈疾患の予防上重要であると考えられる。

【0003】

アディポネクチンの測定法のひとつとして、分析対象物質に対する抗体を利用する免疫学的測定方法が公知である（非特許文献3）。その免疫学的測定手段としては、抗原抗体反応により形成される免疫複合体を測定するために、放射性物質又は酵素を標識体として利用するラジオイムノアッセイ又はエンザイムノアッセイが研究用試薬として用いられている（非特許文献4, 5, 6, 7）イムノアッセイ法では、放射性同位元素を使用するため、測定施設が限定され、通常、検体を500倍希釈することが必要であり、測定時間も20～24時間が必要となっている。また、エンザイムノアッセイに関しては、通常、検体のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）による前処理が必要となり、検体を約5000倍の前希釈することが必要であり、測定時間も2時間以上が必要となっている。このように従来のアディポネクチン測定には、特定の施設が必要であったり、煩雑な操作と長い測定時間が必要であった。

【0004】

前記の各種方法では、病態を鋭敏に反映する血液を検体とした場合、煩雑な操作と測定時間が長いことから汎用性が低く、多検体処理に向いていないのが現状である。従って、迅速且つ簡便であり、測定施設を限定しない自動分析測定試薬の開発が望まれている。

【0005】

【非特許文献1】

「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ（Biochemical and Biophysical Research Communications）」, (米国), 1996年, 第221巻, p. 286-289

【非特許文献2】

「ジーン（Gene）」, (オランダ), 1997年, 第190巻, p. 227-235

【非特許文献3】

広瀬寛ら、演題番号163 血清アディポネクチン濃度とインスリン抵抗性—健常人および2型糖尿病患者における検討、「第75回 日本内分泌学会学術総会 抄録集」、日本内分泌学会、2002年、p. 118

【非特許文献4】

大本安一ら、アディポネクチンのELISAキットについて、「バイオ・クリニカ (Bio Clinica)」, 2002年, 第17巻, p. 156-159

【非特許文献5】

大本安一ら、アディポネクチンELISAキットの開発と血中存在様式の解析、「ディカル・サイエンス・ダイジェスト」, 2002年, 第28巻, 第12号, p. 40-43

【非特許文献6】

「アーテリオスクレローシス・トロンボシス・アンド・バスキュラー・バイオロジー (Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology)」, (米国), 2003年, 第23巻, p. 85-89

【非特許文献7】

「サーキュレーション (Circulation)」, (米国), 2003年, 第107巻, p. 671-674

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の課題は、従来技術の前記の欠点を解消し、被検試料である生物学的液体（例えば、血液、尿、細胞培養液、臓器抽出液、髄液、又は分泌液など、特に血液）を前希釈や前処理する必要がなく、迅速且つ簡便であり、しかも、測定施設を限定しない分析試薬（特には自動分析測定装置用の分析試薬）を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

前記課題は、本発明による、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液を含む、アディポネクチン分析用ラテックス試薬により解決することができる。

また、本発明は、(1) アディポネクチンを含む可能性のある生物学的液体を取得する工程、及び

(2) 前記工程で取得した生物学的液体を、前記工程で取得した状態のままで、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液と接触させ、ラテックス粒子の凝集度合いを光学的に分析する工程を含む、アディポネクチン分析方法に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明では、その分析においてラテックス凝集反応を用いる。本発明における分析対象化合物であるアディポネクチンは、脂肪組織が分泌する生理活性物質である。アディポネクチンは、脂肪組織中に特異的に発現する遺伝子 a p M 1 (adipose most abundant gene transcript) の遺伝子産物として同定された 244 個のアミノ酸からなる分泌タンパク質であり、正常ヒト血中に数 μg ～数十 μg /mL の濃度で存在するが、脂肪細胞特異的分泌タンパク質でありながら、肥満者では有意に血中濃度が低値をとり、冠動脈疾患や 2 型糖尿病、特に大血管症合併例でアディポネクチンの低下を認める。また、アディポネクチンは、インスリン抵抗性及び動脈硬化双方にかかわる分子と捉えることができる。前記アディポネクチンを迅速且つ正確に測定することは、冠動脈疾患の予防上重要であると考えられる。

【0009】

本発明により分析可能な被検試料は、アディポネクチンを含有する可能性のある生物学的液体である限り、特に限定されるものではないが、例えば、生体から直接採取することにより得られる生体液 [例えば、血液 (すなわち、全血)、尿、髄液、又は分泌液など]、あるいは、生体から採取した生体材料 (例えば、臓器、組織、又は細胞など) を処理して得られる生体材料由来液 (例えば、臓器、組織、若しくは細胞の各種抽出液、又は組織若しくは細胞の各種培養液など) などを挙げることができる。

【0010】

アディポネクチンは、例えば、正常ヒト血中には、数 μg /mL ～数十 μg /

mL (例えば、 $0.5 \sim 50 \mu\text{g/mL}$ 、好ましくは $2 \sim 30 \mu\text{g/mL}$ 、より好ましくは $5 \sim 15 \mu\text{g/mL}$) の濃度で存在する。一方、尿、髄液、又は分泌液中には、通常、 $100 \mu\text{g/mL}$ オーダー以上の濃度で存在する。

また、一般的な臨床検査用として調製した生体材料由来液中には、数 $\mu\text{g/mL}$ ～数十 $\mu\text{g/mL}$ の濃度でアディポネクチンが存在する。あるいは、予備実験等により処理液 (例えば、抽出用溶液又は培養用溶液) の量を適宜選択することにより、得られる生体材料由来液中のアディポネクチン濃度を数 $\mu\text{g/mL}$ ～数十 $\mu\text{g/mL}$ とすることができる。

このように、本発明により分析可能な生物学的液体 (特に血液) は、アディポネクチンを数 $\mu\text{g/mL}$ ～数十 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で含むが、本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬により、あるいは、本発明のアディポネクチン分析方法により、前希釈することなく、分析することができる。

【0011】

本発明で用いるラテックス粒子としては、公知のラテックス粒子、例えば、ポリスチレン、又はスチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体等からなるラテックス粒子を挙げることができる。特異的結合体を担持するラテックスの平均粒径は、例えば、被検試料である生物学的液体の種類、アディポネクチンの含有濃度、又は測定機器などに応じて、通常、 $0.05 \sim 1.0 \mu\text{m}$ の範囲で適宜選択することができる。

【0012】

例えば、血中アディポネクチンを分析する場合には、正常ヒト検体中に数 μg ～数十 $\mu\text{g/mL}$ と高濃度にアディポネクチンが存在すること、そして、肥満者では有意に血中濃度が低値になることから、前記ラテックス粒径を適宜選択することにより、血中アディポネクチンの測定系の測定範囲が保証可能となる。例えば、粒径が $0.1 \mu\text{m}$ 以下では、臨床的意義の高い $5 \mu\text{g/mL}$ 以下の測定正確性が保証されないことがあり、粒径が $0.5 \mu\text{m}$ 以上では、正常高値検体の測定ができなくなることがある。従って、血中アディポネクチンの測定系としては、平均粒径 $0.1 \sim 0.5 \mu\text{m}$ のラテックス粒子が好ましい。

【0013】

本発明で用いる特異的結合体は、アディポネクチンと特異的に結合可能であって、しかも、ラテックス粒子に担持した状態でアディポネクチンを含む生物学的液体と接触させた場合にラテックス凝集反応が可能な結合体である限り、特に限定されるものではなく、例えば、抗体（モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体）、あるいは、アディポネクチンに特異的に結合可能なアプタマー（機能性 RNA）を用いることができる。また、抗体の種類としては、免疫グロブリン分子自体のほか、抗体フラグメント、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂ 又はFv等も使用可能である。ラテックス担体の感作は、任意の公知の方法で実施することができ、例えば、抗体を用いる場合には、ラテックス担体に抗体を物理的又は化学的に結合させることにより感作することができる。

【0014】

本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬は、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液を含む限り、その形態は特に限定されるものではないが、例えば、特異的結合体（例えば、抗アディポネクチン抗体）を感作したラテックス粒子と緩衝液との両方を含む1液系の試薬；あるいは、緩衝液である第1試薬と、特異的結合体（例えば、抗体）を感作したラテックス粒子を含む第2試薬とで構成される2液系の試薬など、種々の形態であることができる。

【0015】

本発明のアディポネクチン分析方法は、アディポネクチンを含む可能性のある生物学的液体を取得した後、取得した前記生物学的液体に対して前希釈及び／又は前処理することなく、取得した状態のままで、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液（好ましくは、本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬）と接触させる。

例えば、自動分析測定装置を用いて本発明のアディポネクチン分析方法を実施する場合には、生物学的液体を取得した後、前記生物学的液体を自動分析測定装置に装入する前には、前希釈及び／又は前処理を実施しない。より具体的には、生物学的液体を取得した後、取得した前記生物学的液体に対して前希釈及び／又は前処理することなく、取得した状態のままで、自動分析測定装置内において、

アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液（好ましくは、本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬）と接触させる。

すなわち、本発明方法の好適態様の 1 つである、自動分析測定装置を用いるアディポネクチン分析方法は、

(1) アディポネクチンを含む可能性のある生物学的液体を取得する工程、及び
(2) 前記工程で取得した生物学的液体を、前記工程で取得した状態のままで、自動分析測定装置内において、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液と接触させ、ラテックス粒子の凝集度合いを光学的に分析する工程を含む。

【0016】

本明細書において、「前希釈」とは、生物学的液体を取得した後であって、しかも、ラテックス粒子懸濁液（好ましくは、本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬）と接触する前に実施する希釈、例えば、従来の免疫学的測定法（例えば、ラジオイムノアッセイ又はエンザイムイムノアッセイ）で必要とされる検体の希釈（例えば、可溶化のための希釈工程）を意味する。また、「前処理」とは、生物学的液体を取得した後であって、しかも、ラテックス粒子懸濁液（好ましくは、本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬）と接触する前に実施する種々の処理、例えば、夾雑物の物理的若しくは化学的分離、又は生物学的液体の化学的変性〔例えば、エンザイムノアッセイで必要とされる検体の可溶化剤又は界面活性剤（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム）による変性〕などを意味する。

【0017】

なお、ラテックス粒子懸濁液として、緩衝液である第 1 試薬と、特異的結合体を感じたラテックス粒子を含む第 2 試薬とで構成される 2 液系からなる本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬を用いる場合、通常、生物学的液体と第 1 試薬とを接触させた後、第 2 試薬を接触させる。この場合、第 1 試薬である緩衝液により生物学的液体が希釈されるが、この希釈は、汎用自動分析装置の測定において約 5 分間のインキュベーションとして必ず行われるものであり、本発明

のアディポネクチン分析用ラテックス試薬と接触する前の「前希釈」には該当しない。

【0018】

各種生物学的液体、例えば、血液中のアディポネクチン測定は、従来の測定方法であるラジオイムノアッセイ又はエンザイムノアッセイを用いた場合には、例えば、500～5000倍に検体を希釈するステップを必要としている。また、エンザイムノアッセイでは、検体を可溶化剤又は界面活性剤〔例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）〕で処理するステップを必要としている。

それに対して、本発明のアディポネクチン分析方法では、例えば、ラテックス粒子の粒径を適宜選択する（例えば、血中アディポネクチンの場合には、0.1～0.5 μm の粒径が好ましい）ことにより、検体の前希釈や前処理を必要とせず、原液を試料としてラテックス凝集反応を実施することが可能である。

【0019】

本発明のアディポネクチン分析方法においては、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子（例えば、本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬）を用いて凝集反応を行い、生じた凝集の度合い（凝集度）を光学的に分析（特には測定）することにより、生物学的液体中（例えば、血中）のアディポネクチンの量を分析（特には測定）することができる。ラテックス粒子の凝集度を光学的に分析する具体的方法においては、例えば、目視的に観察するか、あるいは、散乱光強度、吸光度、又は透過光強度を測定する光学機器を用いて測定を行うことができる。好ましい測定波長は300～800 nmである。測定方法は、公知の方法に従い、用いるラテックス粒子の大きさ（平均粒径）若しくは濃度の選択、又は反応時間の設定により、散乱光強度、吸光度、又は透過光強度の増加又は減少を測定することにより行うことができる。また、これらの方法を併用することも可能である。

【0020】

一般的に、ラテックス凝集反応の測定系に存在させる特異的結合体感作ラテックスの濃度は、例えば、共存する塩、タンパク質、又は糖類等の添加物の濃度によって適宜選択することができる。一般には、反応系の最終液量の濃度として、

特異的結合体感作ラテックスが好ましくは0.05~10mg/mL、より好ましくは0.1~2mg/mLになるように、調製することができる。特異的結合体感作ラテックスの濃度が低すぎると、凝集反応の低濃度測定が充分でなくなることがあり、高すぎると、凝集反応の高濃度測定が充分でなくなり、再現性が悪くなることもある。

【0021】

本発明においては、特異的結合体感作ラテックスの凝集反応に影響を与える他の因子を調節することによって、ラテックス粒子凝集反応を更に精密に測定し、低濃度域及び高濃度域の定量可能範囲を更に拡張させることができる。ラテックス凝集反応に影響を与える他の因子としては、例えば、ラテックス粒子の濃度、ラテックス粒子上の抗体感作量、又はラテックス粒子の粒径等を挙げることができる。

【0022】

本発明のアディポネクチン分析方法におけるラテックス凝集反応の条件は、通常の条件と同様であってよく、反応媒体としては、各種生物学的液体中のアディポネクチン分析に応じた各種緩衝液が適宜選択することができる。血中アディポネクチンを分析する場合には、この緩衝液は、血中アディポネクチンを失活させることがなく、しかも、ラテックス凝集反応を阻害しないようなイオン強度やpHを有するものであれば、特に限定されるものではない。例えば、グッド緩衝液、グリシン緩衝液、又はトリス緩衝液などが使用可能である。反応のpHは、5~10、特に6~8が好ましい。反応温度は0~50℃、特に20~40℃が好ましい。反応時間は適宜決定することができる。

【0023】

【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】

《アディポネクチン測定試薬の調製》

(1) 抗アディポネクチン抗体感作ラテックス液の調製

ウサギ由来の抗ヒトアディポネクチン抗体を 0.5 mg/mL の濃度で 0.01 mol/L トリス緩衝液 (pH 8.0) に溶解した液 9 mL に、平均粒径 0.2 μ m のポリスチレンラテックス (固形分 10 重量%) 1 mL を添加し、室温にて 60 分間攪拌した。次いで、この液に、ウシ血清アルブミンを 0.5 重量% 含有する トリス緩衝液 (pH 8.0) を添加し、室温にて 60 分間攪拌した後、この混合液を 20000 rpm で遠心分離した。得られた沈殿物に トリス緩衝液 (pH 8.0) 10 mL を添加し、ラテックスを懸濁させ、抗アディポネクチン抗体感作ラテックス液を調製した。

なお、本実施例では、同一の調製操作に基づく 3 種類の抗アディポネクチン抗体感作ラテックス液 (ロット 01 ~ ロット 03) を調製し、以下の実施例 2 で評価した。

【0024】

(2) 緩衝液の調製

0.5% (重量%) 濃度でウシ血清アルブミンを含有する 0.1 mol/L トリス緩衝液 (pH 8.0) に、0.9% (重量%) 濃度の塩化ナトリウムを添加して緩衝液とした。

【0025】

(3) ヒトアディポネクチン抗原測定試薬

本実施例で使用するヒトアディポネクチン抗原測定試薬は、前記実施例 1 (2) で調製した緩衝液からなる第 1 試薬と、前記実施例 (1) で調製した抗アディポネクチン抗体感作ラテックスからなる第 2 試薬とからなる 2 液系の試薬として構成した。

【0026】

(4) 標準アディポネクチン抗原液

痩身者検体より選択したアディポネクチン高濃度血清を生理食塩水で希釈し、既知濃度のアディポネクチンを含む標準アディポネクチン抗原液を作製した。

【0027】

【実施例 2】

《血中アディポネクチンの測定》

(1) 血中アディポネクチンの測定

測定検体（痩身者検体から採取した血液） $2\mu\text{L}$ に、実施例1（2）で調製した緩衝液 $90\mu\text{L}$ を混合し、 37°C で適時保持した後、実施例1（1）で調製した抗アディポネクチン抗体感作ラテックス液 $90\mu\text{L}$ を添加攪拌し、この後、5分後の波長 570nm での吸光度を測定した。この間の吸光度の変化量を吸光度変化量（ $\Delta A b s$ ）とした。標準アディポネクチン抗原液から得られる $\Delta A b s$ とその抗原濃度とから検量線を作成した。その検量線を用いて、被検サンプルの $\Delta A b s$ からアディポネクチン値を計算した。測定は、日立自動分析装置7170型を用いて行った。

【0028】

結果を表1及び図1に示す。表1及び図1に示すように、抗アディポネクチン抗体感作ラテックス液ロット01～03は、アディポネクチン希釈理論値の低濃度域から高濃度域まで測定可能であることが確認された。

【0029】

【表 1】

| 試薬ロット | ロット 01 | ロット 02 | ロット 03 |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| アデホネク チン希釈 理論値 $\mu\text{g/mL}$ | 感度 $\text{Abs} \times 10^4$ | 感度 $\text{Abs} \times 10^4$ | 感度 $\text{Abs} \times 10^4$ |
| 0.00 | -3 | -2 | -2 |
| 0.20 | 13 | 10 | 12 |
| 0.39 | 26 | 25 | 28 |
| 0.79 | 52 | 52 | 54 |
| 1.18 | 81 | 78 | 82 |
| 1.57 | 108 | 106 | 110 |
| 1.97 | 135 | 133 | 138 |
| 2.36 | 162 | 164 | 164 |
| 2.75 | 191 | 188 | 196 |
| 3.14 | 220 | 215 | 220 |
| 3.54 | 248 | 245 | 254 |
| 3.93 | 275 | 273 | 284 |
| 7.86 | 570 | 567 | 582 |
| 11.79 | 860 | 844 | 877 |
| 15.72 | 1161 | 1140 | 1182 |
| 19.65 | 1443 | 1415 | 1456 |
| 23.58 | 1707 | 1680 | 1722 |
| 27.51 | 1947 | 1895 | 1982 |
| 31.44 | 2164 | 2110 | 2201 |
| 35.37 | 2342 | 2311 | 2405 |
| 39.30 | 2497 | 2486 | 2562 |
| 47.16 | 2679 | 2626 | 2724 |
| 70.74 | 3071 | 2990 | 3115 |
| 94.32 | 3134 | 3052 | 3189 |
| 117.90 | 3042 | 2968 | 3138 |

【0030】

(2) 最小検出限界の決定

測定検体として、健常者検体を用いたこと以外は、実施例 2 (1) の操作を繰

り返した。

結果を表 2 に示す。表において、各記号「N」、「MAX」、「MIN」、「RANGE」、「MEAN」、「SD」、及び「CV」は、それぞれ、「測定対象数」、「最大値」、「最小値」、「最大値と最小値との差」、「平均値」、「標準偏差」、及び「変動係数」を意味する。

表 2 から、 $0 \mu\text{g/mL}$ の ΔAbs の $\text{MEAN} + 2\text{SD}$ と、 $\text{MEAN} - 2\text{SD}$ が重ならない濃度は、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ であることが確認された。

【0031】

【表 2】

| | 0 μ g/mL | 0.1 μ g/mL | 0.2 μ g/mL | 0.3 μ g/mL | 0.4 μ g/mL | 0.5 μ g/mL | 0.6 μ g/mL | 0.7 μ g/mL | 0.8 μ g/mL | 0.9 μ g/mL | 1 μ g/mL |
|----------|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|
| 1 | 0.000 | 0.061 | 0.253 | 0.314 | 0.406 | 0.429 | 0.566 | 0.620 | 0.834 | 0.933 | 0.948 |
| 2 | 0.000 | 0.038 | 0.161 | 0.337 | 0.436 | 0.505 | 0.543 | 0.650 | 0.826 | 0.750 | 1.016 |
| 3 | 0.000 | 0.092 | 0.260 | 0.299 | 0.444 | 0.513 | 0.574 | 0.673 | 0.826 | 0.902 | 1.032 |
| 4 | 0.000 | 0.061 | 0.184 | 0.322 | 0.375 | 0.444 | 0.605 | 0.704 | 0.742 | 0.902 | 1.085 |
| 5 | 0.000 | 0.077 | 0.237 | 0.329 | 0.329 | 0.513 | 0.528 | 0.704 | 0.773 | 0.895 | 1.032 |
| 6 | 0.000 | 0.100 | 0.253 | 0.360 | 0.375 | 0.482 | 0.582 | 0.658 | 0.811 | 0.895 | 1.032 |
| 7 | 0.008 | 0.100 | 0.222 | 0.314 | 0.436 | 0.505 | 0.536 | 0.696 | 0.795 | 0.955 | 0.971 |
| 8 | 0.000 | 0.107 | 0.191 | 0.337 | 0.398 | 0.498 | 0.566 | 0.681 | 0.818 | 0.917 | 0.986 |
| 9 | 0.000 | 0.061 | 0.138 | 0.314 | 0.436 | 0.482 | 0.612 | 0.643 | 0.818 | 0.910 | 1.039 |
| 10 | 0.000 | 0.123 | 0.207 | 0.276 | 0.360 | 0.498 | 0.566 | 0.696 | 0.826 | 0.948 | 1.001 |
| N | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| MAX | 0.008 | 0.123 | 0.260 | 0.360 | 0.444 | 0.513 | 0.612 | 0.704 | 0.834 | 0.955 | 1.085 |
| MIN | 0.000 | 0.038 | 0.138 | 0.276 | 0.329 | 0.429 | 0.528 | 0.620 | 0.742 | 0.750 | 0.948 |
| RANGE | 0.008 | 0.085 | 0.122 | 0.084 | 0.115 | 0.084 | 0.084 | 0.084 | 0.092 | 0.205 | 0.137 |
| MEAN | 0.001 | 0.082 | 0.211 | 0.320 | 0.399 | 0.487 | 0.568 | 0.672 | 0.807 | 0.901 | 1.014 |
| SD | 0.003 | 0.027 | 0.042 | 0.023 | 0.039 | 0.029 | 0.027 | 0.029 | 0.029 | 0.057 | 0.039 |
| CV | 316.23% | 32.36% | 19.83% | 7.17% | 9.78% | 5.93% | 4.84% | 4.29% | 3.60% | 6.34% | 3.86% |
| MEAN-2SD | - | 0.03 | 0.13 | 0.27 | 0.32 | 0.43 | 0.51 | 0.61 | 0.75 | 0.79 | 0.94 |
| MEAN+2SD | 0.01 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

【0032】

(3) EIA法との相関性の確認

本発明のラテックス法は、測定検体として、健常者検体を用いたこと以外は、実施例2(1)の操作を繰り返した。

また、EIA法は、市販研究用試薬（ヒトアディポネクチンELISAキット；大塚製薬株式会社）を用いて実施した。

結果を図2に示す。図2から、市販研究用試薬であるEIA法との相関性は、 $Y = 0.9938x - 0.0015$ ($R = 0.9889$) と良好な相関性が確認された。

【0033】

(4) 夾雑物の影響の確認

測定検体として、健常者検体に各種夾雑物（ビリルビンF、ビリルビンC、ヘモグロビン、乳ビ、イントラファット、又はリウマチ因子）を所定濃度添加した検体を用いたこと以外は、実施例2(1)の操作を繰り返した。

結果を、表3～表14に示す。表3～表14から、ビリルビンF、ビリルビンC、ヘモグロビン、乳ビ、イントラファット、及びリウマチ因子（RF）の各共存物質の各濃度における影響は、全て±10%以内であることが確認された。

【0034】

【表3】

| ビリルビンF | 添加濃度 (mg/dL) | 検体 1 | |
|--------|-----------------|-----------------------------|------------|
| | | 測定値 ($\mu\text{g/mL}$) | 回収率 (%) |
| 0/5 | 0.0 | 2.14 | 100.0% |
| 1/5 | 6.0 | 2.10 | 98.0% |
| 2/5 | 12.0 | 2.09 | 97.5% |
| 3/5 | 18.0 | 2.09 | 97.5% |
| 4/5 | 24.0 | 2.09 | 97.5% |
| 5/5 | 30.0 | 2.06 | 96.3% |

【0035】

【表 4】

| ビリルビンF | 添加濃度 (mg/dL) | 検体 2 | |
|--------|-----------------|----------------------|------------|
| | | 測定値 (μ g/mL) | 回収率 (%) |
| 0/5 | 0.0 | 6.45 | 100.0% |
| 1/5 | 6.0 | 6.45 | 100.1% |
| 2/5 | 12.0 | 6.42 | 99.5% |
| 3/5 | 18.0 | 6.41 | 99.3% |
| 4/5 | 24.0 | 6.43 | 99.6% |
| 5/5 | 30.0 | 6.44 | 99.8% |

【0036】

【表 5】

| ビリルビンC | 添加濃度 (mg/dL) | 検体 1 | |
|--------|-----------------|----------------------|------------|
| | | 測定値 (μ g/mL) | 回収率 (%) |
| 0/5 | 0.0 | 2.07 | 100.0% |
| 1/5 | 6.0 | 2.05 | 99.2% |
| 2/5 | 12.0 | 2.08 | 100.5% |
| 3/5 | 18.0 | 2.05 | 99.2% |
| 4/5 | 24.0 | 2.06 | 99.7% |
| 5/5 | 30.0 | 2.08 | 100.6% |

【0037】

【表 6】

| ビリルビンC | 添加濃度 (mg/dL) | 検体 2 | |
|--------|-----------------|----------------------|------------|
| | | 測定値 (μ g/mL) | 回収率 (%) |
| 0/5 | 0.0 | 6.41 | 100.0% |
| 1/5 | 6.0 | 6.41 | 100.0% |
| 2/5 | 12.0 | 6.43 | 100.3% |
| 3/5 | 18.0 | 6.45 | 100.6% |
| 4/5 | 24.0 | 6.41 | 99.9% |
| 5/5 | 30.0 | 6.37 | 99.4% |

【0038】

【表 7】

| ヘモグロビン | 添加濃度 (mg/dL) | 検体 1 | |
|--------|-----------------|----------------------|------------|
| | | 測定値 (μ g/mL) | 回収率 (%) |
| 0/5 | 0.0 | 2.06 | 100.0% |
| 1/5 | 100.0 | 2.06 | 100.0% |
| 2/5 | 200.0 | 2.04 | 99.2% |
| 3/5 | 300.0 | 2.06 | 100.3% |
| 4/5 | 400.0 | 2.08 | 101.1% |
| 5/5 | 500.0 | 2.06 | 100.2% |

【0039】

【表 8】

| ヘモグロビン | 添加濃度 (mg/dL) | 検体 2 | |
|--------|-----------------|----------------------|------------|
| | | 測定値 (μ g/mL) | 回収率 (%) |
| 0/5 | 0.0 | 6.40 | 100.0% |
| 1/5 | 100.0 | 6.43 | 100.5% |
| 2/5 | 200.0 | 6.26 | 97.9% |
| 3/5 | 300.0 | 6.38 | 99.7% |
| 4/5 | 400.0 | 6.39 | 99.8% |
| 5/5 | 500.0 | 6.41 | 100.3% |

【0040】

【表 9】

| 乳び | 添加濃度 (濁度) | 検体 1 | |
|-----|--------------|----------------------|------------|
| | | 測定値 (μ g/mL) | 回収率 (%) |
| 0/5 | 0.0 | 2.12 | 100.0% |
| 1/5 | 400.0 | 2.13 | 100.5% |
| 2/5 | 800.0 | 2.07 | 97.8% |
| 3/5 | 1200.0 | 2.06 | 97.0% |
| 4/5 | 1600.0 | 2.11 | 99.7% |
| 5/5 | 2000.0 | 2.07 | 97.6% |

【0041】

【表 10】

| 乳び | 添加濃度 (濁度) | 検体 2 | |
|-----|--------------|----------------------|------------|
| | | 測定値 (μ g/mL) | 回収率 (%) |
| 0/5 | 0.0 | 6.38 | 100.0% |
| 1/5 | 400.0 | 6.37 | 99.8% |
| 2/5 | 800.0 | 6.34 | 99.4% |
| 3/5 | 1200.0 | 6.35 | 99.4% |
| 4/5 | 1600.0 | 6.38 | 99.9% |
| 5/5 | 2000.0 | 6.44 | 100.9% |

【0042】

【表 11】

| イントラファット | 添加濃度 (%) | 検体 1 | |
|----------|-------------|----------------------|------------|
| | | 測定値 (μ g/mL) | 回収率 (%) |
| 0/5 | 0.0 | 2.10 | 100.0% |
| 1/5 | 1.0 | 2.12 | 100.8% |
| 2/5 | 2.0 | 2.10 | 100.0% |
| 3/5 | 3.0 | 2.14 | 101.9% |
| 4/5 | 4.0 | 2.15 | 102.2% |
| 5/5 | 5.0 | 2.13 | 101.3% |

【0043】

【表 1 2】

| イントラファット | 添加濃度 (%) | 検体 2 | |
|----------|-------------|-----------------------------|------------|
| | | 測定値 ($\mu\text{g/mL}$) | 回収率 (%) |
| 0/5 | 0.0 | 6.42 | 100.0% |
| 1/5 | 1.0 | 6.42 | 100.0% |
| 2/5 | 2.0 | 6.44 | 100.3% |
| 3/5 | 3.0 | 6.34 | 98.7% |
| 4/5 | 4.0 | 6.32 | 98.4% |
| 5/5 | 5.0 | 6.31 | 98.2% |

【0044】

【表 1 3】

| RF | 添加濃度 (IU/mL) | 検体 1 | |
|-----|-----------------|-----------------------------|------------|
| | | 測定値 ($\mu\text{g/mL}$) | 回収率 (%) |
| 0/5 | 0.0 | 2.10 | 100.0% |
| 1/5 | 50.0 | 2.06 | 98.1% |
| 2/5 | 100.0 | 2.05 | 97.3% |
| 3/5 | 150.0 | 2.10 | 100.0% |
| 4/5 | 200.0 | 2.03 | 96.7% |
| 5/5 | 250.0 | 2.12 | 100.6% |

【0045】

【表 1 4】

| RF | 添加濃度 (IU/mL) | 検体 2 | |
|-----|-----------------|-----------------------------|------------|
| | | 測定値 ($\mu\text{g/mL}$) | 回収率 (%) |
| 0/5 | 0.0 | 6.42 | 100.0% |
| 1/5 | 50.0 | 6.30 | 98.2% |
| 2/5 | 100.0 | 6.39 | 99.6% |
| 3/5 | 150.0 | 6.27 | 97.8% |
| 4/5 | 200.0 | 6.30 | 98.2% |
| 5/5 | 250.0 | 6.42 | 100.1% |

【0046】

【発明の効果】

本発明によれば、ラテックス粒子を使用し、ラテックス凝集反応に基づく生物学的液体中（好ましくは血中）のアディポネクチンの分析において、検体を前処理することや、前希釈することなく、低濃度領域から高濃度領域まで測定範囲を拡大することができる。また、迅速且つ簡便であり、しかも、測定施設を限定しない。

近年、多数の被検試料を短時間に処理するための自動分析装置が普及し、更に高感度化が要求されることと相まって、特に、抗体（又は抗原）を結合したラテ

ックス粒子との凝集反応を利用するラテックス凝集法が汎用されている。本発明によれば、前処理及び／又は前希釈を必要としないので、短時間（例えば、約10分～15分）で測定が可能である。本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬（好ましくは、血液中のアディポネクチン分析用ラテックス試薬）は、自動分析測定装置用の分析試薬として適している。

【図面の簡単な説明】

【図1】

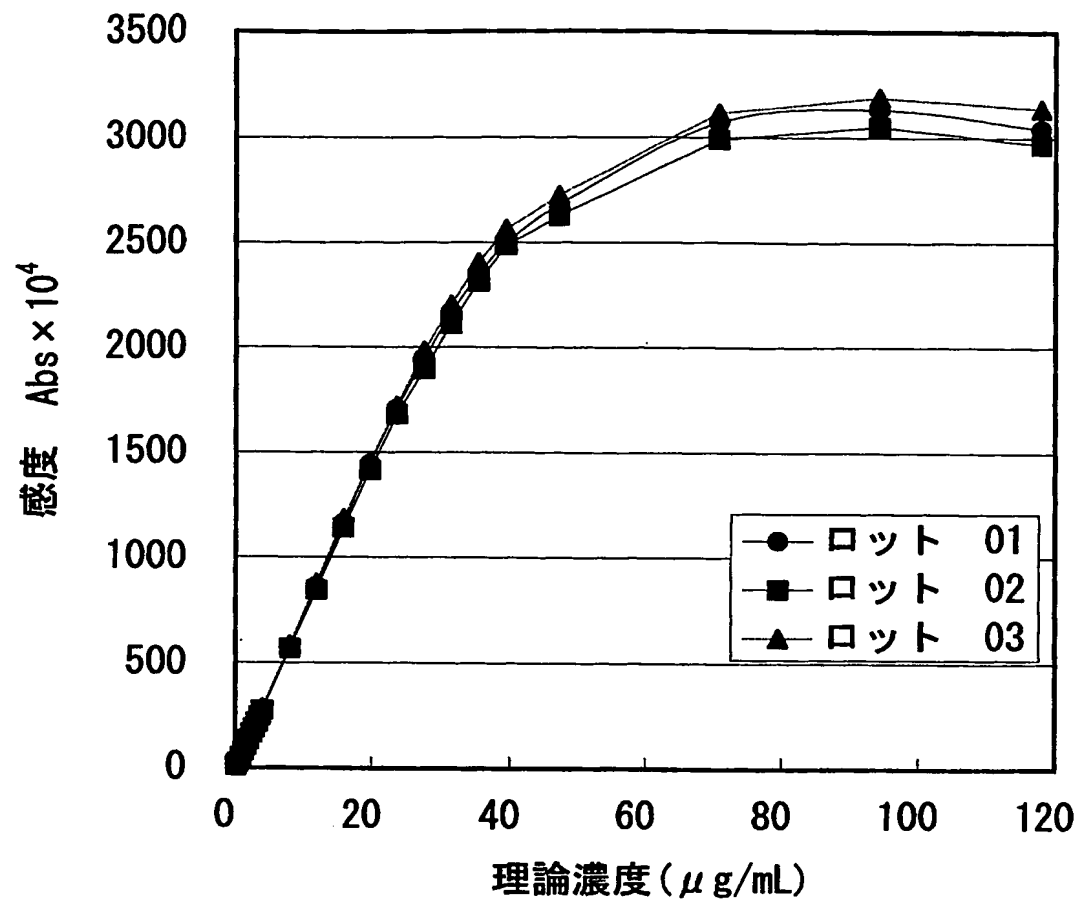
本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬を用いて、健常者検体を測定した結果を示すグラフである。

【図2】

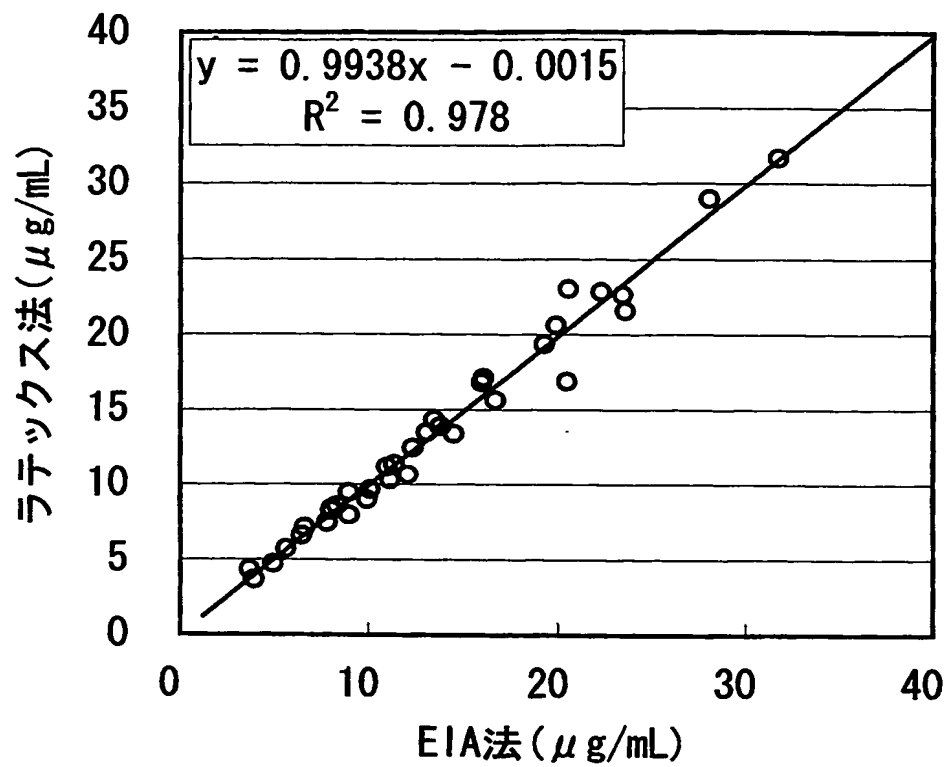
本発明のアディポネクチン分析用ラテックス試薬と、従来法であるEIA法との相関を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 被検試料である生物学的液体を前希釈や前処理する必要がなく、迅速且つ簡便であり、しかも、測定施設を限定しないアディポネクチン分析用ラテックス試薬及び分析方法を提供する。

【解決手段】 前記アディポネクチン分析用ラテックス試薬は、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液を含む。前記アディポネクチン分析方法是、（１）アディポネクチンを含む可能性のある生物学的液体を取得する工程、及び（２）前記工程で取得した生物学的液体を、前記工程で取得した状態のままで、アディポネクチンに対する特異的結合体を担持したラテックス粒子懸濁液と接触させ、ラテックス粒子の凝集度合いを光学的に分析する工程を含む。

【選択図】 なし

認定・付加情報

| | |
|---------|----------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2003-080763 |
| 受付番号 | 50300472829 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第一担当上席 0090 |
| 作成日 | 平成15年 3月31日 |

<認定情報・付加情報>

| | |
|-------|-------------|
| 【提出日】 | 平成15年 3月24日 |
|-------|-------------|

次頁無

特願 2003-080763

出願人履歴情報

識別番号 [000138277]

1. 変更年月日 1990年 8月23日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都千代田区東神田1丁目11番4号
氏 名 株式会社ヤトロン
2. 変更年月日 2003年 7月16日
[変更理由] 名称変更
住 所 東京都千代田区東神田1丁目11番4号
氏 名 株式会社三菱化学ヤトロン

特願 2003-080763

出願人履歴情報

識別番号

[000206956]

1. 変更年月日

1990年 8月27日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都千代田区神田司町2丁目9番地

氏名

大塚製薬株式会社